(19) 日本日本日(1 b)

(13 公開特許公報(4)

存開2002-128690

(二) 李群田國公園毎年

(P2002-128690A)

(43)公開日 平成14年5月9日(2002.5.9)

4C084 101 32/00 43/00 A 6 1 P 29/00 A 6 1 K 37/02 1000000 101 35/00 A 6 1 K 38/00 A61P 29/00 51) Int.Cl.

審査額次 未離次 翻次項の数2 01 (全 5 頁)

(11) 出版人 588152747 広知 使成	東京都文式成内丘1-20-6-503 東京都文式成内丘1-20-6-503 (74)代理人 10005870
(71) HEE	(12) 発明者 (14) 代理人 F ターム(番
(%) (17 2000 316464(P2000 316464)	平成12年10月17日(2000. 10. 17)
(21)出版時代	(22) HIND E

(54) [58] 見いたいのは、 これには、 これにはいは、 これにはいは、 これにはいは、 これにはいはにはいは、 これにはいはにはいは、 これにはいはにはいは、 これにはいはにはいは、 これにはいはにはいは、 こ

【解決手段】 TNF-a及び1L-4を有効成分とす (57) [更約]

性関節リウマチ治療剤、自己免疫疾患治療剤、肝炎、肝 【効果】 本発明アポトーシス誘導的は、TNF-a又 は1L-4を単独で用いた場合に比べ、アポトーシス略 導効果が相類的に増強され、制作用の少ない制癌剤、便 硬度等の肝疾患治療剤等として使用できる。 るアポトーシス部導利。

【艪宋項1】 TNF-a及び1L-4を有効成分とす 5アポトーシス航導剤。

【精求項2】 悪性腫瘍又は慢性関節リウマチの予防

治療薬である請求項1記載のアポトーシス誘導剤。

[発明の詳細な説明] [0000]

[発明の属する技術分野] 本発明はアポトーシス誘導剤 こ関するものである。

[0002]

【従来の技術】アポトーシスはプログラムされた細胞死 の一形態であり、古典的細胞死(ネクローシス)と対比 されるものである。アポトーシスは生理学上の種々の条 の接触の欠乏、細胞質の濃縮化、エンドヌクレアーゼの **活性に関連したクロマチンの凝縮及び核模線、核の分節** 化、粗粒装面の微絨毛の消失、粗粒装面の平滑化(粗粒 クレアーゼによるDNAの断片化が観察され、アポティ ック体細胞の最終断片が隣接する細胞により貧食される 件下に起こり、その形態学的特徴として、周囲の細胞と 装面の水疱形成:membrance blebbing)及びエンドヌヌ

【0003】アポトーシスは正常な発生・分化に不可欠 な生理的細胞死であり、正常な生体組織の細胞回転など その結果、細胞に機能障害が生じるものと考えられてい る。例えば、ワタナペーフクナガSはMRLIpr/I ガティブセレクション (アポトーシス) 機構がうまく作 3 (Watanabe-Fukunaga, R., et al., Nature, 356, 314 -317 (1992))。また、慢性肝炎が肝硬変、肝癌に移行 って、斯かる疾患に関与する細胞のアポトーシスを誘導 において個々の細胞に起こっているが、 駆性腫瘍、 白血 病、増殖性皮膚疾患、慢性関節リウマチ、自己免疫疾患 prマウスにおいては、アポトーシスに関与するFas 分子に異常があり、胸眼における自己反応性T細胞のネ 動せず、その結果自己免疫疾患が発症すると示唆してい していく過程では、アポトーシスは抑制状態にあり、こ 糠維化、肝硬変へと違庭するものと考えられている。従 れがサイトトキシックT細胞による肝細胞の炎症に続く 等の疾患においては、アポトーシスが過剰に抑制され、 する物質は、当眩疾患の予防・治療薬として有用であ

ミドやRNA 台成阻害剤であるアクチノマイシンD、腿 キシン(LT)等のサイトカイン製にアポトーシスの略 J. Lumunol., 145,1859-1867 (1990), Strelow, A., et al., J. Exp. Ned., 192, 601-611(2000))、また最近 【0004】従来、蛋白合成阻害剤であるシクロヘキシ **協議死因子(以下、「TNFーa」という)やリンホト** 蹲作用があることが報告され(Nartin,S.J.. et al..

に、ヒト単球や好酸球に対してアポトーシス誘導作用が

特閒2002-128690

3

816(1992), J.Ailergy Ciin. Janunol.. 102(6 Pt 1), 10 あることが報告されている(J.lmunol.,148(6),1812-1

アポトーシス誘導活性や副作用の点から充分なものでは なく、アポトーシス誘導活性が高く且つ安全性の高いア ポトーシス誘導剤が求められていた。 [0000]

【0005】しかし、これまでに知られている物質は、

【発明が解決しようとする課題】本発明は、有効性が高 く且つ安全性の高いアポトーシス誘導剤を提供すること を目的とする。 [0001]

に鑑み、アポトーシス誘導活性を有する物質について鋭 象研究した結果、TNF-aと!L-4を併用した場合 に、未分化細胞や前隔体細胞に対してそれぞれが有する アポトーシス誘導効果が相乗的に増強され、アポトーシ スの過剰抑制に伴う疾患の予防・治療薬として有用であ 【課題を解決するための手段】本発明らは、斯かる契情 ることを見出し、本発明を完成した。

[0008] すなわち、本発明は、TNF-a及び1L --4を有効成分とするアポトーシス誘導剤を提供するも O7&5.

[0000]

H., lamunology Today, 7 (4), 115-119 (1986) : Sci ence, 245, 301-305 (1989) ,

数様として魅じられている (Dovall, E. and Wyllie, A.

TNFーαとILー4を有効成分とするものであるが、 ここで、TNFーαとは、炎症を通した生体防御機構を 中心に、抗腫瘍作用、破骨作用、細胞への脂質の取り込 み阻略作用、インターロイキン--やコロニー刺微田子 の生産誘導作用等、多様な生物活性を示す分子置17k Daのポリペプチドであり、1L-4とは、広い配田の **免疫苗間刺激作用(B 苗間の形質苗間への分代、T 粗閻** の分化増強)を中心に、抗闘衛作用、「型アレルギー縣 導作用、抗炎症作用等を有するサイトカインの一種であ る。これらTNF-a及び1L-4には前述したように TNF-aとIL-4を併用した場合に、核アポトーシ ス誘導効果が相乗的に増強されることは全く予測するこ アポトーシス誘導作用があることが報告されているが、 【発明の実施の形態】本発明のアポトーシス誘導剤は、

【0010】本発明のアポトーシス誘導例に用いられる 及びIL-4としての活性を有する、天然型収いは遺伝 子組換えにより産生された組換え体の何れもが包含され TNFーa及びILー4としては、それぞれTNF-a とができなったことである。

ウイルス (Sendal Virus) 包徴ヒトBリンパ料研棋BA 11-1などの既存の相間株の培養上済より、アフィニ 従い精製することにより得ることができ、遺伝子の相換 【0011】天然型のTNF-aは、例えば、センダイ ティークロマトグラフィーやHPLCなどの配知方法に

えによって得られるTNF-aは、昭知の遺伝子を組み

ではインターロイキン4 (以下、「1L-4」という)

時間2002-128690

(10mg/ml+10mg/ml)を添加又は非添加 (対照群) に 価間を0.1%TrltonX-100及び0.1%ク エン酸ナトリウムを含むPBS200μ1に浮遊し、P 4 ℃で10分)後フローサイトメーター(EPICS XL:Cov lter)にて染色陽性細胞(アポトーシス形細胞)を測定 した。結果を喪しに示す。尚、培地は、RPMI-16 00 unit/ml)、ストレプトマイシン (100 μg/ml)、 Lーグルタミン (0.3mg/ml) 及びFBS (10% fetalb ovine serum: Life Technologies社製)を添加して用い た。また、SCF (stem cell factor) 、GM一CSF

B/ml) 磁位、1 L-4 (10mg/ml) 磁位、その函数

て2週間培養した。培養後、 PBSにて細胞を洗浄し、

(1 ng/ml)を添加した倍地で韓製し、TNFーα (10

らんだプラスミド或いはベクターを導入した大関菌や既 **序細胞株の魔生斑白を同様に精製することにより得るこ** 【0012】また、天然の1L-4は、ヒトT細胞クロ - ンや米特値丁価値吸いは任義の既存価値依をマイトジ エン等で非刺激吸いは刺激した培養上清から回様に辞製 して収得でき、組換え!しー4も既存遺伝子の利用によ って前記と周様にして得ることが可能である。

nとILー4とが単一の製剤中に含まれるように顕製さ るものでもよい。また、TNF-aとIL-4の配合比 ことができ、特にTNF-aを30~10%、IL-4 hてもよく、吸いは、TNF-aとIL-4のそれぞれ **率は、アポトーシス誘導作用の相乗効果が発揮できれば** 特に限定されずそれぞれ1~99%の眼囲で混合される **【0013】本発明のアポトーシス誘導剤は、TNF-**を別個の製剤として腐製し、これら2つの製剤を併用す を10~30%で配合することが好ましい。

はしししょを母独で用いた場合に比べ、アポトーシス類 従って、TNFーα又はILー4を単独で投与する場合 【0014】このようにして間製された本発明のアポト ーシス精導剤は、後配英施例に示すようにTNF-a又 導効果が若しく増強されるという相乗作用を発揮する。 に比べて両右の投与国を大幅に減少させることができ、 別作用の軽減が可能となる。

【0015】本発明のアポトーシス結構剤の成人に対す TNFーαについては、固第一日当たり50μg/body〜 5 0mg/body程度であり、1 L-4については、一日当 たり50 μg/body~50mg/body程度とするのが貸まし る一日当たりの投与重は、広範囲に適宜選択されるが、

各種の投与形貌で使用される。斯かる製剤は、通常使用 される充填剤、増量剤、結合剤、付湿剤、崩壊剤、装面 活性剤、滑沢剤等の看釈剤或いは賦形剤を無導性薬理担 刺、丝剤、注射剤(液剤、脆質剤等)、点眼剤等が挙げ 【0016】本発明のアポトーシス誘導剤は、その使用 目的に応じ、阪燕製剤としてこの分野で慣用されている 体として用いて開製される。剤形は、治療目的に応じて 各種の形態が選択でき、この代表的なものとして錠剤、 丸剤、散剤、粧剤、懸瘍剤、乳剤、顆粒剤、カプセル

【0017】鮭剤の形像に成形するに際しては、担体としてこの分野で従来公知のものを広く使用でき、例えば 乳糖、白糖、塩化ナトリウム、ブドウ糖、尿素、デンプ 職等の異形型、犬、Hダノーゲ、プロペノーガ、却ツロ **シブ、ファウ鶴後、デンプン後、ガシチン溶液、カルボ** リン酸カリウム、ボリピニルピロリドン糖の結合剤、乾 **軽アンアン、アレギン軽ナトリウム、センテン米、サミ** ナラン末、収替水煮ナトリウム、収穀カルシウム、ポリ ン、哎費カルシウム、カメリン、結晶セルロース、ケイ **キシメギルセドロース、カサック、メチルセドロース、**

ル等の滑沢剤等が例示できる。更に錠剤は必要に応じ適 一、水素添加油等のሰ磨抑制剤、第4級アンモニウム塩 島、ラウリル硫酸ナトリウム等の吸収促造剤、グリセリン、デンブン等の保温剤、デンブン、乳糖、カオリン、 **スントナイト、コロイド状ケイ酸等の吸着剤、精製タル** オキシエチレンンルピタン脂肪酸エステル類、ラウリル ク、ステアリン酸塩、ホウ酸末、ポリエチレンゲリコー 硫数ナトリウム、ステアリン数モノグリセリド、デンブ 常の利皮を施した錠剤、例えば糖衣錠、ゼラチン被包 ン、乳糖等の崩壊剤、白糖、ステアリン、カカオパタ 錠、即溶核錠、フィルムコーティング錠あるいは二重 錠、多層錠とすることができる。

【0018】丸剤の形態に成形するに際しては、損体と カオリン、タルク等の賦形剤、アラビアゴム末、トラガ ント末、ゼラチン、エタノール等の結合剤、ラミナラン してこの分野で従来公知なるものを広く使用でき、例え ばブドウ糖、乳糖、デンプン、カカオ脂、硬化植物油、 カンテン等の崩壊剤等が倒示できる。

【0019】 坐剤の形體に成形するに際しては、担体と して従来公知のものを広く使用でき、例えばポリエチレ ングリコール、カカオ間、高級アルコール、高級アルコ **一ルのエステル類、ゼラチン、半合成グリセライド等を** 巻げることができる。

び懸瀾剤は殺菌され、且つ血液と等張であるのが好まし く、これら液粒、乳剤及び酸温剤の形態に成形するに繋 しては、希釈剤としてこの分野において慣用されている ロピレングリコール、エトキシ化イソステアリルアルコ 一方、ポリオキシ化インステアリルアルコール、ポリオ キシエチレンソルビタン脂肪酸エステル類等を挙げるこ とができる。尚、この場合等張性の溶液を闢製するに充 分な皿の食塩、ブドウ糖あるいはグリセリンを医薬製剤 中に含有せしめてもよく、また通常の溶解補助剤、緩衝 【0020】注射剤として餌製される場合には、液剤及 ものを全て使用でき、例えば水、エチルアルコール、プ 即、無痛化剤等を添加してもよい。

【0021】 更に本発明アポトーシス誘導剤中には必要 こ応じて着色剤、保存剤、香料、風味剤、甘味剤等や他 の医薬品を含有せしめてもよい。

マチ(RA)等の酵原病、潰瘍性大腸炎、シェーグレン 【0022】かくして得られる本発明のアボトーシス勝 導剤は、アポトーシス誘導作用に基づいて、アポトーシ スの過剰抑制に起因する各種疾患に適用でき、所留の薬 AIDS、ARC (AIDS阿達疾題)、ATL (成人 「細胞白血病:Adult T-celllenkemla)、毛様細胞性白 血病(Hairy cell leukemla)、脊髄症(HAN/TSP)、呼 (HAU) 等のH T L V — 1 隔速疾患、自己免疫疾患、例 えばSLE (全身性エリテマトーデス)、慢性関節リウ 虚陨群、原発性胆汁性肝硬变、突発性血小板减少性紫斑 理効果を期待できる。該適用疾患としては、例えば癌、 **双器障曹(HAB/HABA)、関節虚(HAAP)、ブドウ殿炎**

症、子宫筋腫、気管支喘息、動脈硬化症、各種先天性奇形症、腎炎、老人性白内障、慢性疲労症候群(Chronic リン依存型(1型)糖尿病等を例示できる。また、本発 明のアポトーシス誘導剤は、骨髄異形成症候群、周期性 C型、A型、B型、F型等の各種の肝炎、アルツハイマ - 棟、アルツハイマー型老年御呆症、心筋炎、ARDS (成人呼吸急追症候群)、感染症、肝硬変、前立腺肥大 Faligiu Syndrome)、筋ジストロフィー(Myolonic dys 自己免疫性溶血性貧血、重症筋無力症、槁本病、インス 血小板减少症、再生不良性貧血、突発性血小板减少症、 祝発性血質内凝固症等の血小板減少を伴う各種の疾患、 爾 (Idlopathic Thrombocytopenic Purapura: ITP) 、 Irophy)等の各種疾患にも適応可能である。

4 O 培地(Life Technologies社製)にペポシリンG(I

1 現色(10μg/ml Propidium lodideの10μ1を恐加し

r)、TNF-a及びIL-4は、いずれも市販品 (Pepr

o Tech EC社製)を用いた。

[0026]

(granulocyte-macrophage colonystimulating facto

の化学療法剤として知られている各種の制癌剤や放射線 【0023】特に、本発明アポトーシス誘導剤を制癌剤 として用いる場合、その投与により癌細胞に対してアポ トーシスを誘導でき、制癌作用を発揮するが、これを癌 き、副作用の軽減を図ることもできる。斯かる化学療法 協和発酵工業株式会社製)、マイトマイシン(Nitomycl 義製薬株式会社製)、トヨマイシン (Toyomicin, 武田 **刺としては、例えば5-フルオロウラシル(5-FU、** n-C、同上社製)、フトラフール (FT-207、大明 療法と併用すれば、制癌効果を一層助畏することがで 薬品工業株式会社製)、エンドキサン(Endoxan, 集品工業株式会社製)等が挙げられる。

[0024]

【実施例】以下に爽施例を挙げて、本発明を更に詳細に 説明する。 東施例 1

8 (1) 活動型慢性関節リウマチ患者の骨髄検体から、市 販キット (Histopaque:Signa社製)を用いて、濃度勾配 +)を得た。分離回収した細胞は、CD34+細胞が約 法により単核球を分離した。分離した単核球から磁気ビ 【0025】 (2) CD34+細胞を24ウエル平底マ ウエルになるようにSCF (10ng/ml) とGMーCSF ーズ (Dynal CD34 progenitor cells selection syste e: Dyna1社製)を用いてCD34開性細胞 (CD34 イクロプレート (No.3596:Costar) に1. 0×105/ 95%でCD19+B相配は0.5%以下であった。

光華哲寺 (PI現在田野光) 7. 13 £.03 10.7 2.08 1YF- a / 1L-4 板製料料 羅衣 1.VF-0 Ξ

[0021] 表1より、TNFーa及び1Lー4を併用 した本発明のアポトーシス誘導剤は、TNF-a又は1 しー4を単独で用いた場合に比べ、死細胞率が相乗的に 増強することが示された。

を用い、実施例1(2)と同様にして、TNF-a及び Hela組物(子宮頸部編平上皮癌由来ヒト培養細胞) | L - 4の併用効果を試験した。尚、He | a細胞は、 2×101/クエルにて96クエルプレートに抽象し た。結果を喪2に示す。 【0028】 実施例2

SF [数2] 死回题母(PI陽性細胞)(%) SCF/CM-CSF SCF/CM-CSF SCF/CM-CSF 1L-4 1NF-a/1L-4 東野江年

[0029]

[0030] 表2より、TNFーa及び1Lー4を併用 増強することが示された。

α又は1L-4を単独で用いた場合に比べ、アポトージ **【発明の効果】本発明アポトーシス耗導剤は、TNFー** ス誘導効果が相乗的に増強され、副作用の少ない制格 [0031]

した本発明のアポトーシス誘導剤は、TNF-a又は1 L-4を単独で用いた場合に比べ、死細胞率が相乗的に

€

炎、肝硬変等の肝疾患治療剤等として使用できる。

剤、慢性関節リウマチ治療剤、自己免疫疾患治療剤、肝